

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

6

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **04271792 A**

(43) Date of publication of application: **28.09.92**

(51) Int. Cl

C12P 19/14
/(C12P 19/14 , C12R 1:06)

(21) Application number: **03034615**

(22) Date of filing: **28.02.91**

(71) Applicant: **MITSUBISHI KASEI CORP**

(72) Inventor: **TOMITA FUSAO**
YOKOTA ATSUSHI

(54) PRODUCTION OF DIFRUCTOSE-DIANHYDRIDE
III

(57) Abstract:

PURPOSE: To efficiently produce the subject compound useful as a low calorie sweetener, etc., by culturing the genus *Arthrobacter* bacterium having an inulin-decomposing ability in a medium containing the inulin and yeast extract to react the inulin with the enzyme.

CONSTITUTION: The genus *Arthrobacter* bacterium [e.g. *Arthrobacter.SP-MCI-2496* (FERN P-11288)] having an inulin-decomposing ability is cultured in a medium

containing at least inulin and 0.04-0.8% of an yeast extract at 0-50°C for 12-120°C, and the cultured solution is centrifuged to remove the cells of the bacteria. The supernatant as a crude enzyme solution containing the inulin-decomposing enzyme is added to a 50mM citric acid buffer solution (pH of 5.5) containing 5% of the inulin and subsequently subjected to their reaction at 60°C for 10min, followed by stopping the reaction at 100°C for 5min to provide the objective difructose.dianhydride III.

COPYRIGHT: (C)1992,JPO&Japio

6

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-271792

(43) 公開日 平成4年(1992)9月28日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/14		Z 8214-4B		
// (C 1 2 P 19/14				
C 1 2 R 1:06)				

審査請求 未請求 請求項の数2 (全 4 頁)

(21) 出願番号	特願平3-34615	(71) 出願人	000005968 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22) 出願日	平成3年(1991)2月28日	(72) 発明者	富田 房男 札幌市西区八軒3条西4丁目11-53
		(72) 発明者	横田 篤 札幌市西区八軒3条西3丁目6-7-24
		(74) 代理人	弁理士 長谷川 一 (外1名)

(54) 【発明の名称】 ジフルクトース・ジアンヒドリドIIIの製造方法

(57) 【要約】

【構成】 少なくともイヌリン及び0.04~0.8%の酵母エキスを含む培養液中で、イヌリン分解酵素産生能を有するアルスロバクター属に属する細菌を20~50℃、12~120時間程度培養してイヌリン分解酵素を得、これをイヌリンと反応させてジフルクトース・ジアンヒドリドIII (DFAIII) を得る。

【効果】 上記のような培養方法により、イヌリン分解酵素を効率よく生産でき、その結果低カロリー甘味料として有用なDFAIII を効率よく経済的に生産することができる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくともイヌリン及び0.04～0.8%の酵母エキスを含む培養液中で、イヌリン分解酵素産生能を有するアルスロバクター属に属する細菌を培養して得られるイヌリン分解酵素とイヌリンを反応させることを特徴とするジフルクトース・ジアンヒドリドIIIの製造方法

【請求項2】 アルスロバクター属に属する細菌がアルスロバクター・エスピー・MC I 2496 (微工研菌寄第11288号) であることを特徴とする請求項1記載のジフルクトース・ジアンヒドリドIIIの製造方法

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はジフルクトース・ジアンヒドリドIII (以下、DFAIII ということもある) の製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする問題点】 ジフルクトース・ジアンヒドリドIII は2個のフラクトース分子が1-2' 及び2-3' で脱水縮合した二糖類であり、ジャクソンらにより1929年に単離同定されている (Bur. stand. J. Res., 3, 27, 1929)。

【0003】 DFAIII は、動物体内では代謝されず、非発酵性の糖であるため、低カロリー甘味料として注目されており、今後美容食等多方面に利用されることが予想される。ジャクソンらは、フルクトースを主成分とする多糖分であるイヌリンを酸加水分解することにより、DFAIII を得ているが収率はわずか2%弱であり、化学的に生産する方法として効率的とは言えない。

【0004】 そこで近年、微生物学的方法を利用してイヌリンからDFAIII を製造する方法が提唱されている。1972年に田中らにより、アルスロバクター・ウレアファシエンスの生産するイヌリン分解酵素を用いてイヌリンからDFAIII を生産させることが報告されている (Biochim. Biophys. Acta, 284, 248, 1972)。

【0005】 また、田村らによりシュードモナス・フルオレッセンスの生産するイヌリン分解酵素を用いてイヌリンからDFAIII を生産させることが提案されている (特開昭63-219372号公報)。しかし、それらのDFAIII の生産能は工業的に使用するには未だ十分とは言えず、従来、微生物を用いる方法によるDFAIII の製造方法は、まだ経済的とはいえず、効率的に酵素を生産せしめDFAIII を生産させる方法の提供が要望されていた。

【0006】 冨田らは、アルスロバクター・エスピー・MC I-2496 [微工研菌寄第11288号 (FERMP-11288)] 由来のイヌリン分解酵素により、従来より効率よくDFAIII を製造することができることを報告している [90年農芸化学学会大会予稿集第357

(2)

特開平4-271792

2

頁 (1990)、89年発酵工学会予稿集第234頁 (1989) 及び特願平2-59699号公報]。

【0007】

【問題点を解決するための手段】 本発明者らは、更に、イヌリンからDFAIII を効率良く製造する方法について培養条件に着目して鋭意研究を進めた結果、イヌリン分解酵素産生能を有するアルスロバクター属に属する細菌、例えばアルスロバクター・エスピー・MC I 2496 (微工研菌寄第11288号) を酵母エキスを0.04～0.8%含む培養液で培養することにより、イヌリン分解酵素を良好に産生させることができ、培養液中のイヌリンを分解してDFAIII を更に効率よく生産させる事を見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】 すなわち、本発明の要旨は、少なくともイヌリン及び0.04～0.8%の酵母エキスを含む培養液中で、イヌリン分解酵素産生能を有するアルスロバクター属に属する細菌を培養して得られるイヌリン分解酵素とイヌリンを反応させることを特徴とするDFAIII の製造方法に存する。

【0009】 以下、本発明を説明する。本発明で使用するイヌリン分解酵素産生能を有するアルスロバクター属に属する細菌としては、例えば、特願平2-59699号公報に記載されているようなアルスロバクター・エスピー・MC I 2496 [微工研菌寄第11288号 (FERMP-11288)]、特開平1-225492号公報に記載されているようなアルスロバクター・イリシス MC I 2297 [微工研菌寄第9893号 (FERMP-9893)]、アルスロバクター・ウレアファシエンス (Biochim. Biophys. Acta, 284, 248, 1972) 等が挙げられる。

【0010】 本発明で使用する培養液は、キクイモ、ゴボウ、チコリ等のイヌリン含有量の高い植物の抽出液及び/又はイヌリンを唯一の炭素源として含む。通常、イヌリン量は培養液中0.5%以上、好ましくは1～4%。特に好ましくは1～2%含む。また、本発明の培養液は、有機窒素源として酵母エキスを0.04～0.8%、好ましくは、0.05～0.7%、特に好ましくは、0.1～0.5%含む。従来、イヌリン分解酵素産生能を有するアルスロバクター属に属する細菌を培養する際、酵母エキスは0.02%程度しか使用されていなかったが、上記範囲とすることによってイヌリン分解酵素を培養上清に効率よく産生させることができる。その他、培養液中には、無機窒素源として、硫酸アンモニウム、硝酸ソーダ、尿素、硝酸カリウム等、その他必要に応じて、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、リン酸、硫酸及びその他のイオンを生成する無機塩類を添加することは有効である。

【0011】 具体的には、例えば、下記のような組成の培養液が好適に使用できる。

(3)

特開平4-271792

3

イヌリン	0.5%以上
酵母エキス	0.04~0.8%
硝酸ナトリウム	0.04~0.6%
硫酸マグネシウム	0.04~0.3%
塩化カリウム	0.04~0.3%
リン酸1カリウム	0.04~0.3%
塩化第二鉄	0.001~0.01%

pH6.5~7.5

かかる培養液中で上記アルスロバクター属に属する細菌の培養は、培養温度20~50℃で、12~120時間程度振とう培養を行うのが好適である。

【0012】本発明においては、イヌリン或いはキクイモ、ゴボウ等のイヌリン含有量の高い植物の抽出液を唯一の炭素源として含む溶液中で、上記のようにして得られるイヌリン分解酵素を作用させる。その際、該細菌そのものを作用させてもよいし、また、該細菌から該酵素を抽出し、それを作用させてもよい。酵素を作用させる場合、まず前記方法により培養を行った培養液を遠心分離により除菌し、得られたろ液に硫酸(65%飽和)を加え塩析を行い、析出した沈澱物を遠心分離により取得し、少量の水に懸濁させたのち透析を行い、粗酵素液を得る。この粗酵素液を例えばpH7.0に調整した0.01~0.1Mのリン酸緩衝液中でイヌリンに作用させることによって所望のDFAIIIが得られる。本粗酵素液は、例えばDEAE-Toyopearl 650M, SP-Toyopearl 650Mカラム(東ソー製)によるイオン交換クロマトグラフィーにて精製を行うことにより、電気泳動的に単一のバンドを示す酵素標品を得ることができる。

*

酵母エキス (%)	イヌリンフラクトトランスフェラーゼ活性 (U/ml)
0.02	55.2
0.05	66.7
0.1	78.9
0.5	88.5
0.7	68.3
1	47.5

【0015】(実施例2) 実施例1と同様の基本培地にイヌリン1%と酵母エキス0.5%を加え27℃、72時間培養後の上清のイヌリンフラクトトランスフェラーゼ活性を測定したところ、92U/mlであった。この粗酵素液を用いてDFAIIIを生産させた。反応液は、50mMクエン酸緩衝液pH5.5、イヌリン25%および粗酵素液を最終活性として18.4U/ml含み、全量50mlとした。60℃で4時間反応させ、反応溶液中に蓄積するDFAIIIを定量したところ、12.5

4

*【0013】

【実施例】以下に実施例をあげて本発明の方法をさらに具体的に説明するが、本発明はその要旨を越えない限りこれらに限定されるものではない。

(実施例1) 硝酸ナトリウム0.5%、硫酸マグネシウム0.05%、塩化カリウム0.05%、リン酸1カリウム0.05%、塩化第二鉄0.001%を含んだ基本培地にイヌリン1%及び、酵母エキスをそれぞれ0.02%、0.05%、0.1%、0.5%、0.7%、1%加えた培地100mlをpH7.0に調整して500mlの坂口フラスコに入れ、120℃20分間蒸気滅菌した。この滅菌した培地にアルスロバクター・エスピーMC12496菌を1白金耳接種し、160rpmで27℃、30時間培養した。培養終了後遠心分離により菌体を除去し、培養濾液を得た。得られた培養濾液を粗酵素液とする。粗酵素液中のイヌリンフラクトトランスフェラーゼの活性は粗酵素液に5%のイヌリン、50mMクエン酸緩衝液pH5.5を含む全量1mlの反応液を用いて測定した。この反応液を60℃で10分間反応させ、100℃で5分間煮沸することにより反応を停止させた。生成したDFAIIIをHPLCで定量した。なお1unit(U)の酵素量は、本条件下で1分間に1μmolのDFAIIIを生産する酵素量と定義した。その結果酵母エキスの量を変化させた時の培養液中のイヌリンフラクトトランスフェラーゼの活性は以下の表1のようになった。

【0014】

【表1】

gのイヌリンから10.3gのDFAIIIが生成した。収率は82.4%であった。

【0016】(実施例3) 実施例1と同様の基本培地に酵母エキス0.5%及びイヌリンをそれぞれ0.5%、1%、2%、5%、加えた培地で27℃30時間培養し、培養液上清中のイヌリンフラクトトランスフェラーゼの活性は以下の表2のようになった。

【0017】

【表2】

(4)

特開平4-271792

5

6

イヌリン (%)	イヌリンフラクトトランスフェラーゼ活性 (U/m1)
0.5	53.1
1	88.5
2	82.8
5	63.4

【0018】

【発明の効果】本発明の製法によれば、アルスロバクテ
 ー属に属する細菌を酵母エキスを0.04~0.8%含
 みイヌリンを含んだ培養液で培養することによりイヌリ

ン分解酵素を効率良く生産させ、その培養上清中のイヌ
 リン分解酵素とイヌリン溶液を反応させることにより、
 DFAIII を効率良く経済的に取得することが可能とな
 る。

【手続補正書】

【提出日】平成3年7月31日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正内容】

【0009】以下、本発明を説明する。本発明で使用する
 イヌリン分解酵素産生能を有するアルスロバクター属
 に属する細菌としては、例えば、特願平2-59699
 号公報に記載されているようなアルスロバクター・エス
 ピーMC12496〔微工研菌寄第11288号(FE
 RMP-11288)〕、特開平1-225492号公

報に記載されているようなアルスロバクター・イリシス
 MC12297〔微工研条寄第2279号(FERMB
 P-2279)〕、アルスロバクター・ウレアファシエ
 ンス(Biochim, Biophys, Acta, 284, 248, 197
 2)等が挙げられる。

【旧寄託機関の名称】工業技術院微生物工業研究所

【旧受託番号】微工研菌寄第9893号(FERM
 P-9893)【新寄託機関の名称】通商産業省工業技術院微生物工
 業技術研究所【新受託番号】微工研条寄第2279号(FERM
 BP-2279)